



## Artículo Original

# Actividad antibacteriana in vitro de las nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa* sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1

## In vitro antibacterial activity of nanoparticles of *Curcuma longa* on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1

Javier Arica-Pajares<sup>1</sup>, Ana León-Matos<sup>1</sup>, Jersson Ascate-Lezama<sup>1</sup> y Julio Arellano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> EAP de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú. <sup>2</sup> Departamento académico de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas – UNT.

### RESUMEN

Se evaluó el efecto antibacteriano que tienen los curcuminoides del rizoma de *Curcuma longa* ("cúrcuma") sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, al aumentar su biodisponibilidad mediante su obtención a nivel de nanopartículas. Se obtuvo el polvo de 3kg de rizomas de cúrcuma. Dichos rizomas fueron previamente lavados, pelados, picados y dejados a secar durante una semana a 45 – 50 °C, para luego ser molidos hasta obtener un polvo. Posteriormente para la obtención de las nanopartículas se utilizó la técnica de nanoprecipitación rápida utilizando una cabina cerrada de mezcla por choque de chorros modificada, en el cual 25 mg del polvo de cúrcuma se disolvieron en 2.5 mL de un solvente orgánico miscible en agua (en este caso etanol absoluto) los cuales se mezclaron con un antisolvente (agua desionizada). Las nanopartículas de cúrcuma con un diámetro menor a 100 nm siendo el diámetro mínimo de 29 nm, los cuales son reproducibles en términos de tamaño de partículas y distribución. Para la detección de los curcuminoides se utilizó un espectrofotómetro UV-vis obteniéndose un rango máximo de longitud de onda entre 423 a 430 nm. En conclusión, a la concentración de 100% de nanopartículas hay efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1.

**Palabras clave:** *Cúrcuma longa*, nanoprecipitación rápida, Nanopartículas, *Pseudomonas aeruginosa*.

### ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the antibacterial effect of curcuminoids of *Curcuma longa*'s rhizome ("turmeric") on growth of *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, increasing its bioavailability by obtaining nanoparticles from turmeric. For which, powder of 3Kg of turmeric rhizomes was obtained. These rhizomes were previously washed, peeled, chopped and left to dry for a week at 45-50 °C for then be grounded to obtain a powder. Subsequently to obtain nanoparticles, Flash nanoprecipitation technique was use, using a confined impingement jets mixer modified in which 25 mg of turmeric powder were dissolved in 2.5 mL of an organic solvent miscible in water (in this case absolute ethanol) which was mixed with an anti-solvent (deionized water). Turmeric nanoparticles were obtained with a diameter less than 100 nm being the minimum diameter of 29 nm. They are reproducible in terms of particle size and distribution. An UV-vis spectrophotometer was used to obtain a maximum wavelength range between 423-430 nm for detection of curcuminoids. It was concluded that a concentration of 100% of nanoparticles has antibacterial effect on the growth of *P. aeruginosa* CMH-1.

**Key words:** *Curcuma longa*, Flash nanoprecipitation, Nanoparticles, *Pseudomonas aeruginosa*.

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa*, bacteria Gram negativa, es responsable de una amplia variedad de infecciones agudas y crónicas, tales como: bacteremia, neumonía, infecciones producidas en pacientes con heridas de quemaduras. Asimismo, debido a su elevada resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos por la formación de biopelículas y producción de múltiples factores de virulencia<sup>1</sup>; dificulta los tratamientos existentes para su control.

*Curcuma longa*, mejor conocida como “cúrcuma”, “palillo” o “azafrán indio”, es una planta herbácea, perenne de origen asiático que pertenece a la familia Zingiberaceae. Se cultiva principalmente en China, India, Indonesia, Jamaica <sup>2</sup> y Perú <sup>3</sup>. Esta planta ha sido utilizada por siglos en la medicina indígena para el tratamiento de una variedad de condiciones inflamatorias<sup>4</sup>, como antibacteriano, antifúngico y antiviral <sup>5</sup>.

La curcumina, principal componente de *C. longa*, junto con otros dos compuestos de la misma naturaleza (demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) son extraídos del rizoma de la planta <sup>2</sup>. Estos curcuminoides no producen efectos secundarios en el hombre y en animales, además no son tóxicos a altas dosis <sup>6,7</sup>; sin embargo, uno de los mayores problemas es su biodisponibilidad <sup>8,9</sup>. En consecuencia, se han desarrollado diversas formulaciones, tales como nanopartículas, liposomas, micelas y complejos fosfolipídicos; las cuales han conseguido aumentar la biodisponibilidad de la curcumina así como mejorar su permeabilidad y resistencia a procesos metabólicos <sup>10,11</sup>.

Las nanopartículas reciben actualmente una enorme atención como herramienta para la administración de fármacos y compuestos lipofílicos. Estas se pueden producir mediante una técnica simple denominada nanoprecipitación rápida (flash nanoprecipitation) (FNP) <sup>12</sup>.

Han y col. emplearon un sistema cerrado de mezcla por choque de chorros con dilución (Confined Impingement Jets Mixer with Dilution. CIJ-D-M), que es más simple que el diseño original propuesto por Johnson and Prud'homme <sup>13</sup>. El diseño requiere un impulso de flujo igual con dos chorros opuestos, uno conteniendo el compuesto hidrofóbico en un solvente orgánico y el otro, conteniendo un antisolvente, generalmente agua. La etapa de dilución posterior en el nuevo diseño permite un rápido enfriamiento con una alta concentración de antisolvente, que mejora la estabilidad de la nanopartícula <sup>12</sup>. Chow y col. utilizaron el CIJ-D-M para producir nanopartículas irregulares de curcumina con un tamaño menor a 100 nm <sup>14</sup>.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación dirigida a demostrar que mediante el uso de nanopartículas del rizoma de *C. longa*, obtenidas por nanoprecipitación rápida, aumenta la biodisponibilidad de los curcuminoides y, por consiguiente, éstos incrementan su efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*.

## MATERIAL MÉTODOS

### Material biológico:

- Rizomas de *Curcuma longa* obtenidos del mercado “Mayorista” (Trujillo, Perú), proveniente de la selva peruana.
- Cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1, proporcionado por el Centro Médico Hematológico – Piura (Trujillo, Perú) con una confiabilidad de identificación de 99,99% de, mediante el equipo MicroScan autoSCAN-4 System.

### Obtención del polvo de *Curcuma longa*:

Se lavaron 3 kg de rizomas de cúrcuma con agua de caño para eliminar impurezas, a continuación se dejaron secar a temperatura ambiente (23°C - 25 °C) y luego se procedió a pelarlos con un pelador de cocina. Una vez pelados se cortaron en trozos pequeños para después dejarlos secar en una caja de tecnopor con un foco de 60 wattz dentro, simulando un horno de unos 45°C – 55°C por el lapso de una semana. Finalmente se molió en un molino de discos hasta obtener un polvo lo más fino posible.

### Extracción de curcuminoides:

Se adicionó 1g de polvo de cúrcuma por cada 100 mL de etanol absoluto (PANCREAC QUIMICA SA).

### Obtención de suspensión nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa* <sup>14</sup>:

Se utilizó un sistema similar al CIJ-D mixer (“Confined Impingement Jets mixer” / Cabina cerrada de mezcla por choque de chorros), <sup>12</sup> elaborado por la empresa SERMETAME S.R.L. Siguiendo la técnica de nanoprecipitación rápida<sup>13</sup>, se empleó etanol absoluto como solvente orgánico de la cúrcuma y agua desionizada (Obtenida por desionizador HIDROMAQ) como antisolvente. La mezcla resultante se dejó caer en 45 mL de agua desionizada para aumentar la sobresaturación

#### **Caracterización de las nanopartículas:**

La caracterización de las nanopartículas se realizó en la Sección de Nanociencia y Nanotecnología del Laboratorio de Física de Materiales. La presencia de los curcuminoides en la suspensión se comprobó mediante espectrofotometría, utilizando un Espectrofotómetro UV/Vis/NIR Lambda 750s marca PerkinElmer. Y el tamaño promedio de las nanopartículas se determinó mediante la Técnica de Dispersión dinámica de Luz (Dynamic light scattering / DLS), para lo cual se utilizó el equipo NICOMP Nano Z3000.

#### **Reactivación del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1:**

El cultivo puro de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 brindado en el medio de transporte Amies se reactivó sembrando la bacteria en una placa de Petri con Agar Müller-Hinton y puesto a incubación a 37°C/14horas. Luego se conservó el cultivo en placa a 4 °C.

#### **Determinación de la fase log de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1:**

Se realizó una suspensión del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) equivalente al tubo N°0,5 del Nefelómetro de McFarland. Luego se extrajo 1mL de esa suspensión y se lo adicionó a un sistema de agitación continuo con 99 mL de caldo nutritivo y se incubó a 37°C. A los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas, se extrajeron muestras de 0,5 mL y se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se sembraron 1 mL por incorporación en su respectiva placa de Petri, estas se incubaron a 37°C/24h. Posteriormente se realizó el recuento de colonias en cada placa y finalmente se construyó la curva de crecimiento, de la cual se determinó la duración de la fase logarítmica de la bacteria.

#### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):**

Se siguió el protocolo establecido en Clinical and Laboratory Standards Institute <sup>15</sup>.

#### **Preparación de las placas mediante el método de difusión:**

Se preparó una suspensión bacteriana de acuerdo al estándar del tubo N°0.5 del Nefelómetro de McFarland y se sembró, por superficie, 0.1 mL de esta suspensión en agar Müller Hinton. Posteriormente se realizaron 4 pocillos equidistantes en el agar a los cuales se les agregó una solución de nanopartículas de curcuminoides (a dos pocillos), una solución al 5% de etanol absoluto en agua desionizada y agua desionizada, respectivamente en los pocillos 1, 2, 3 y 4; siendo los 2 últimos controles. Además se colocó un disco de antibiótico contra *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en el centro de la placa a manera de control positivo. Finalmente las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. El ensayo se repitió 3 veces.

#### **Evaluación de los halos de inhibición:**

Luego de las 24 horas de incubación, se procedió a medir los halos de inhibición.

## **RESULTADOS**

Mediante el método de “Flash Nanoprecipitación” se obtuvieron nanopartículas con un diámetro promedio de 106.1 nm con un 100 % en número (Fig. 1).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la suspensión de nanopartículas de curcuminoides, a las diferentes concentraciones empleadas sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1, determinó que sólo la concentración de 100% tuvo efecto antibacteriano (se observó turbidez en los demás tubos, Fig. 2); asimismo, el resultado de la evaluación realizada mediante el método de difusión en disco confirmó el efecto antibacteriano de los curcuminoides al 100%, mediante una zona de inhibición de 14.5 mm en Agar Müller Hinton (Fig. 3).

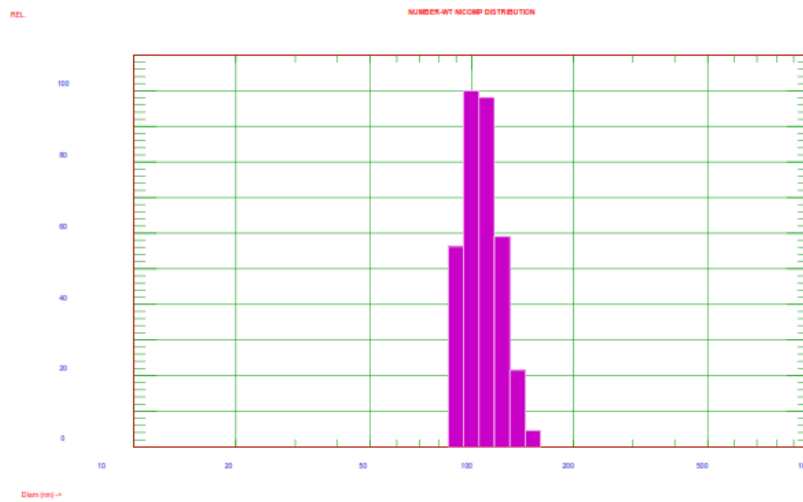


Fig. 1: Tamaño de las nanopartículas de los rizomas de *Curcuma longa*, medidas por DLS.

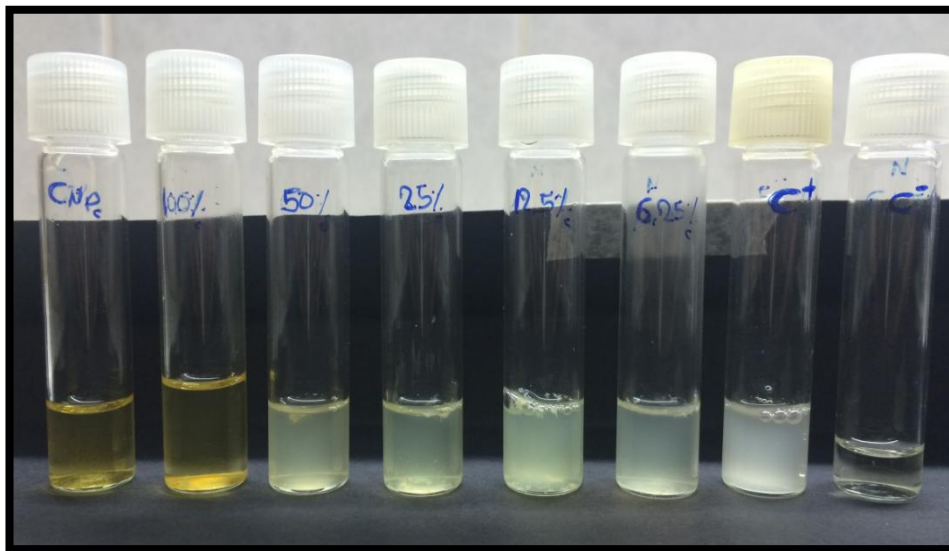
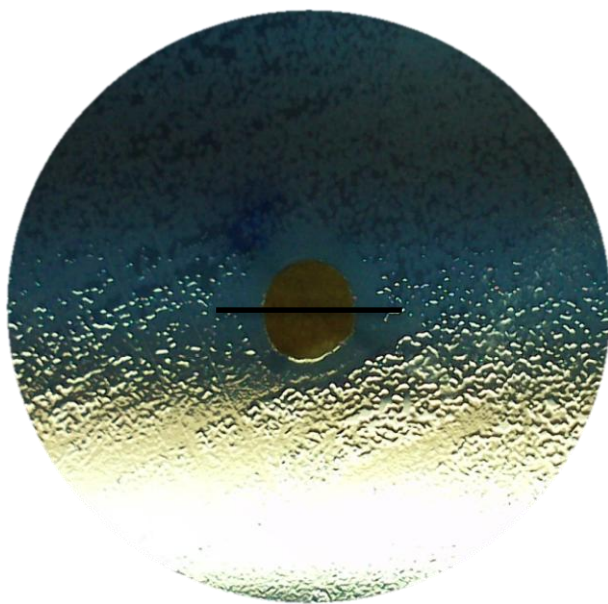


Fig. 2: CMI de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en Caldo Nutritivo.



**Fig. 3:** Zona de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CMH-1 en agar Müller Hinton.

## DISCUSIÓN

Para la obtención de nanopartículas, la selección de un solvente orgánico apropiado es esencial para su producción, debido a la técnica de precipitación del antisolvente. La selección es comúnmente guiada por la miscibilidad del solvente en agua (antisolvente) y la solubilidad de la droga (“cúrcuma”) en el solvente<sup>1</sup>. Basado en estas consideraciones se tomó como solvente etanol químicamente puro y como antisolvente agua desionizada para producir nanopartículas de curcuminoides de 106.1 nm, mediante el método de Flash Nanoprecipitación<sup>12</sup>, estables en el tiempo a 4°C. Lo que concuerda con Chow SF et al<sup>14</sup>, quienes lograron producir nanopartículas de un tamaño menor a 100 nm.

Dichas nanopartículas tienen un efecto antibacteriano cuando se las emplea en una concentración al 100%. No obstante, van perdiendo efecto conforme se van diluyendo, tal como se observa en la **Fig. 1** mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI)<sup>15</sup>.

Chakraborty B et al.<sup>17</sup> demostraron que la actividad antibacteriana de un extracto acetónico de *C. longa* tiene alta actividad antibacteriana frente al crecimiento de *P. aeruginosa*. Por su parte, Bhawana et al.<sup>16</sup> demostraron que la curcumina puede ser soluble en agua cuando está en su forma nano. Por lo tanto, mediante ensayos antibacterianos de la suspensión de nanocurcumina demostraron que la transformación a nano mejora la solubilidad en agua y la eficacia de la curcumina como un agente antimicrobiano.

Los curcuminoides obtenidos del rizoma de *C. longa*, en su forma nano, aumenta su solubilidad en agua e incrementa su efecto in vitro como agente antimicrobiano en el crecimiento de *P. aeruginosa* CMH-1.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*. 2014. doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.021
2. Ravindran P, Nirmal K, Sivaraman K. *Turmeric the genus Curcuma*. New York: Taylor y Francis Group, 2007
3. Mostacero León J, Castillo Picón F, Mejía Coico FR, Gamarra Torres OA, Charcape Ravelo JM, Ramírez Vargas RA. *Plantas medicinales del Perú. Taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica*. Perú: Asamblea Nacional de Rectores, 2011.

4. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen.* 1998; 6(2): 167-177.
5. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandsarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral and antifungal activity of curcumin. *BioMed Res Int.* 2014: 186864
6. Shankar TN, Shantha V, Ramesh HP, Murthy IA and Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guinea pigs & monkeys. *Indian J Exp Biol.* 1980; 18 (1): 73-75
7. Soni KB, Kuttan R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1992; 36(4): 273-275
8. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharmaceutics.* 2007; 4(6): 807-818
9. Sharna RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 453-470
10. Tiyafoonchai W, Tungpradit W, Plianbangchang P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2007; 337 (1-2): 299-306
11. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat.* 2014; 46(1): 2-18.
12. Han J, Zhu Z, Qian H, Wohl AR, Beaman CJ, Hoyer TR, et al. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J Pharm Sci.* 2012; 101(10): 4018-4023.
13. Johnson BK, Prud'homme RK. Chemical processing and micromixing in confined impinging jets. *AIChE J.* 2003; 49(9): 2264-2282.
14. Chow SF, Sun CC, Chow AH. Assessment of the relative performance of a confined impinging jets mixer and a multi-inlet vortex mixer for curcumin nanoparticle production. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014. doi: 10.1016/j.ejpb.2014.07.004.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard M100-S22. 7<sup>th</sup> edition Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
16. Bhawana, Basniwal RK, Buttar HS, Jain VK, Jain N. Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(5): 2056-2061.
17. Chakraborty B, Nath A, Saikia H, Sengupta M. Bactericidal activity of selected medicinal plants against multidrug resistant bacterial strains from clinical isolates. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(1): 435-441.

<b>Correspondencia:</b> Julio Arellano Barragan. Email: jarellano@unitru.edu.pe
---